CytoFLEX フローサイトメーターでの DuraClone 試薬の測定：CytoFLEX コンペンセーションライブラリーを用いた装置設定

Dr. Nicole Weit[1], Dr. Andreas Böhmler[1], Dr. Michael Kapinsky[2]

1 ベックマン・コールター社（ドイツ・クレーフェルト）、2 ベックマン・コールター・イムノテック S.A.S（フランス・マルセーユ）

SUMMARY

従来のコンペンセーション値設定は光電子増倍管（PMT）設定に対するものであったため、単一染色チューブを何度も繰り返すことが必要でした。全検出範囲のほぼ全域に渡りリニアリティを示すファイバーアレイフォトダイオードを使用する CytoFLEX*は、あらゆるゲイン設定のコンペンセーションを自動的に再計算することができます。そのため、特定のロットの単染色の測定を 1 回行い、コンペンセーションライブラリー内に保存しておけば、もしゲイン調整を行った場合でも、再度、コンペンセーションを行う必要はありません。

INTRODUCTION

タンデム色素は、マルチカラーフローサイトメトリーにおいて重要な役割を果たします。しかし、不適切な保管条件、光や酸素への曝露により継時的に起こるタンデム色素の分解は、蛍光スペクトルに大きな影響を及ぼすため、コンペンセーション調整を頻繁に行わなければならないことがあります。さらに、製造業者によってタンデム色素のスペクトルが異なるため、ロットごとのコンペンセーション設定が必要となります。

ベックマン・コールターは、室温保存で長期の蛍光色素安定性を保証する独自の新しい DuraClone 型の Dry 試薬を開発しました。ロットにマッチした Dry 試薬タンデム色素による正確で精密なコンペンセーションなどの装置設定は、容易でフローサイトメーターの熟練者でなくても操作が可能です。本稿では、CytoFLEX フローサイトメーターの手順について述べています（フィルター構成が確実に色素の組合せに合うようにしてください）。

PROTOCOL

材料

各 DuraClone IM kit には、マルチカラーパネルと検出器調整およびコンペンセーション設定用のシングルカラーの Dry 試薬の入ったチューブで構成されています。現在、販売しているパネルリストについては、11 ページの表または WEB（ http://www.DuraClone.com/im/ ）をご覧ください。

その他試薬：ベックマン・コールター試薬

- CytoFLEX Daily QC Fluorosphere
- VersaLyse Lysing Solution
- IOTest 3 Fixative Solution
- VersaComp Antibody Capture Kit

サンプルの染色および装置の準備

サンプルの染色：

1. 染色の詳細な説明は、DuraClone IM kit に添付の取扱説明書（IFU）を参照してください。
2. DuraClone Compensation Kit および VersaComp beads を用いたコンペンセーション設定用のシングルカラー染色：
    a. 十分に混合した VersaComp Antibody Capture Negative Bead および VersaComp Antibody Capture Positive Bead 各 1 滴を DuraClone IM Kit の Compensation Kit の各チューブの底に添加し、よく撹拌します。
    b. 室温（20～30°C）で、暗所で 15 分間インキュベートします。
    c. バッファ 1 mL を VersaComp beads の入った各チューブに加えます（VersaComp IFU を参照）。
    d. よく撹拌します。
    e. 300 x g で 6 分間遠心し、上清を除去します。
    f. バッファ 600 µL に再懸濁します。ビーズ溶液は、測定するまで暗所で保存します。

BECKMAN COULTER
Life Sciences

CytoFLEX 装置の準備：

1. CytoFLEX システムのスタートアッププログラムを実行します。
2. CytoFLEX ユーザーマニュアルに従い、品質管理（QC）手順を実行します。
3. 検出器の構成を確認します。

CYTOFLEX コンペンセーションライブラリーの作成

DuraClone IM kit の新しいロットごとに、下記のステップを実行します。

1. 単染色を測定については、File メニューから「New Compensation」を選択してください（図 1）。
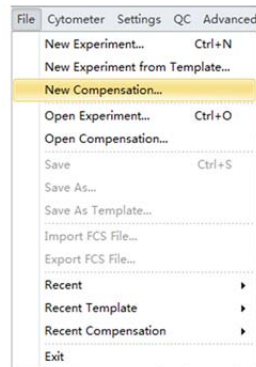
図 1

2. ファイルの保存場所を選択し、新しいコンペンセーションを「DuraClone xxx Lot yyy」として保存します。xxx は「IM T Cell」などのパネル名、yyy は DuraClone IM kit のロット番号に置き換えてください（図 2）。
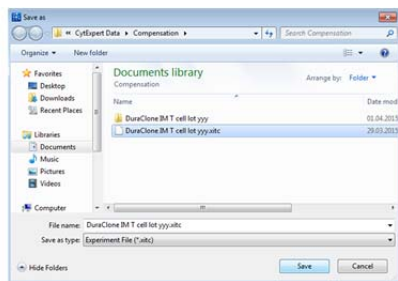
図 2

3. 「Compensation Setup」ウインドウ（図 3）画面で、使用するすべての蛍光色素のチューブを選択し、「Label」として染色に使用する抗体を入力し、また、容易に識別できるようロット番号を入力してください。サンプルタイプは「ビーズ」を選択します。
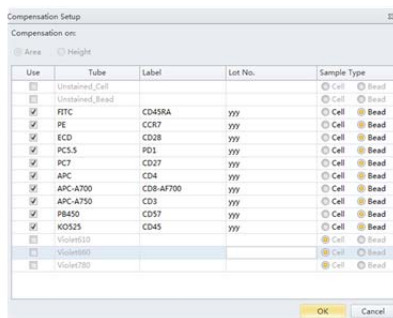
図 3

4. 推奨されたゲイン設定をインポートしてください：
   a. 画面左側の「Acq. Setting…」を選択します。
   b. Acq. Setting ウインドウが表示します（図 4）。
   c. Acq. Setting ウインドウ中の「Gain」タブを選択します。
   d. 装置の QC 設定で測定するため、「Recommended」を選択します。

図 4

5. 単染色ポジティブコントロールを実行してください：
   a. 単染色ポジティブチューブをサンプルローディングポジションに置きます。
   b. CytExpert ソフトウェア上で、適切なチューブを選択します。
   c. FSC／SSC プロット上でゲートを動かし、必要な集団を囲みます。適宜、ゲートを動かしてポジティブ集団を囲みます（図 5）。

注記：スレッショルドツールを使用し、最初のチューブでスレッショルドを調整してください。容易に VersaComp beads の表示をするには、プロットプロパティのメニューの「Auto」機能を利用します。
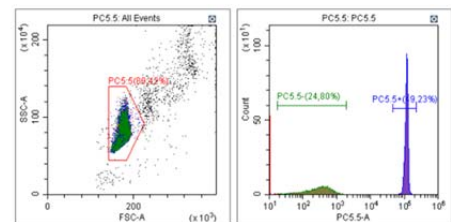
図 5

6. すべての測定したサンプルチューブのデータのゲーティングが適切であることを確認してください。

7. コンペンセーションメニュー（図 6）の「Compensation Calculation」を選択し、コンペンセーション値を計算してください。

図 6

コンペンセーションマトリックスのウインドウ（図 7）が現れ、算出されたコンペンセーション値が表示されます。

Compensation Matrix

☑ Use ☐ Show Autofluorescence Area

Cha...	-FIT...	-PE%	-EC...	-PC...	-PC...	-AP...	-AP...	-AP...	-PB...	-KO...	-Vio...	-Vio...	-Viole...
FITC		1,32	0,75	0,14	0,00	0,07	0,16	0,08	0,19	0,67	0,00	0,00	0,00
PE	14,80		15,25	1,62	0,00	0,01	0,07	0,03	0,07	0,42	0,00	0,00	0,00
ECD	6,09	56,34		0,93	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,26	0,00	0,00	0,00
PC5.5	1,39	15,06	39,68		0,00	0,23	1,33	0,01	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00
PC7	1,19	10,05	31,88	40,00		0,22	4,58	2,74	0,23	0,41	0,00	0,00	0,00
APC	0,00	0,00	0,69	4,43	0,00		0,86	7,23	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00
APC...	0,00	0,00	0,11	45,61	0,00	9,95		0,95	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00
APC...	0,00	0,02	0,23	35,62	0,00	7,95	104,...		0,00	0,10	0,00	0,00	0,00
PB4...	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,11	0,03		3,36	0,00	0,00	0,00
KO5...	2,91	0,06	0,36	0,00	0,00	0,04	0,15	0,09	16,97		0,00	0,00	0,00
Viol...	0,44	6,46	10,38	0,07	0,00	0,06	0,08	0,06	1,17	55,41		0,00	0,00
Viol...	0,33	3,29	6,82	0,97	0,00	3,10	0,14	0,25	0,66	35,91	0,00		0,00
Viol...	0,93	1,64	6,10	26,21	0,00	1,50	23,94	18,28	1,01	21,01	0,00	0,00	

Save to Compensation Library... Save As... Close

図 7

8. 「Save as…」を選択し、生成されたコンペンセーションマトリックスの保存場所および名称、例えば「DuraClone xxx Lot yyy」を選択してください。

9. 「Save to Compensation Library…」を選択し、例えば「DuraClone xxx Lot yyy」などのキーワードを指定して、カラーコンペンセーション値をコンペンセーションライブラリーに保存してください。

フローサイトメトリー取得：最初のアプリケーション設定

1. 「File」から「New Experiment」を選択してください。

2. 保存場所と名称、例えば「DuraClone xxx」を選択し、xxx を「IM T Cell」などのパネル名に置き換えてください。

3. 「Settings」メニューから「Set Label」（図 8）を選択し、染色に使用する抗体のラベル記述名を入力してください。

Set Label

Channel	Label
FITC	CD45RA-FITC
PE	CCR7-PE
ECD	CD28-ECD
PC5.5	CD279-PC5.5
PC7	CD27-PC7
APC	CD4-APC
APC-A700	CD8-AF700
APC-A750	CD3-APCA750
PB450	CD57-Pacblue
KO525	CD45-KrO
Violet610	CD95-BV605
Violet660	CD25-BV-650
Violet780	CD127-BV785

Apply to:
◉ Current Tube ○ All Tubes
OK Cancel Apply

図 8

4. 「Settings」メニュー（図 9）から「Compensation Matrix」を選択し、「Import」機能を選択し（図 10）、ロットに合った DuraClone コンペンセーションマトリックスを選択し、コンペンセーションマトリックスおよびゲインをインポートしてください。図 11 に示すようにコンペンセーションマトリックスおよびゲインのインポートを選択します。

図 9

図 10

図 11

5. 必要なプロットおよびゲーティングを作成します。必要なプロットと適切な停止条件が含まれるよう注意してください。

6. 全ての抗体で染色したチューブを測定し、パターンと集団の信頼性を確認してください。

7. 必要に応じ、Acq. Setting ウインドウ中のゲインタブ下で、各チャンネルのゲイン設定を調整してください。ゲインを上げるとシグナルは増加し、ゲインを下げるとシグナルは減少します。

8. または、グラフィックコントロール領域のツールバー上のゲインコントロールボタンで、データ取得中にデータプロット上で直接、細胞集団を Grab & Drop しゲイン値を調整してください。初期設定として調整したゲイン設定を保存するには、「Cytometer」→「Acq. Settings…」→「Gain」→「Set as default」と進みます。

注記：ゲイン設定を変更する場合、サンプル測定前に、コンペンセーション値はコンペンセーションライブラリーからをインポートされ、現在のゲインで変更されている必要があります。詳細については、CytoFLEX IFU および V.4 項を参照してください。

9.　「File」→「Save as template…」と選択し、実験テンプレートを作成してください。例えば「DuraClone xxx」を選択し、xxx を「IM T Cell」などのパネル名に置き換えてください（図 12）。
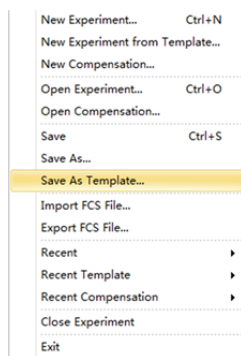
図 12

フローサイトメトリー取得：テンプレートの使用

1.　ファイルメニュー中の「New Experiment from Template」ダイアログボックスを開いてください（図 13）。
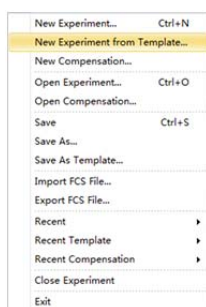
図 13

2.　保存されたテンプレート、例えば「DuraClone xxx」を選択し、新規 Experiment の名前および場所を決めてください（例：「DuraClone xxx 日付」）。

3.　「Acq. Settings」ウインドウを開き、「Gain」を選択してください。
    a.　「Recommended」を選択し、QC 設定を行ってください。
    b.　「Default」を選択し、以前定めた設定を使用します。

4.　ライブラリーからコンペンセーションをインポートしてください。
    a.　コンペンセーションマトリックスのウインドウを開いてください（図 14）。
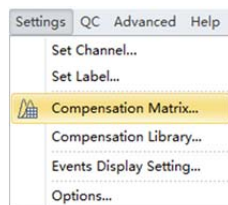
図 14

    b.　「Import from Library…」を選択してください（図 15）。
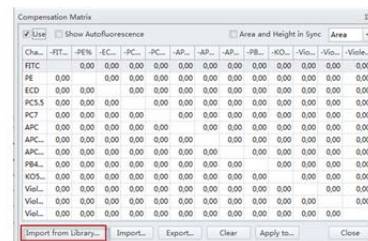
図 15

5.　適切なキーワード（「DuraClone xxx Lot yyy」）の単染色をロードして「OK」をクリックしてください（図 16）。
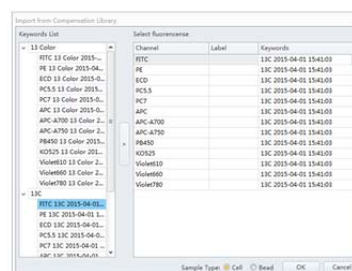
図 16

6.　「Import compensation matrix and transform with current gain」を選択し、「OK」をクリックしてコンペンセーション値をインポートしてください（図 17）。
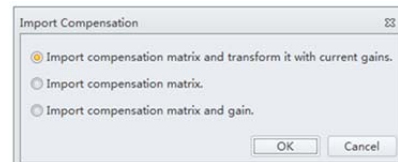
図 17

7.　Experiment に Tube を追加し、必要に応じて Label を設定します。

8.　サンプルの測定を開始します。

RESULTS

ここに示した手順を行うと、CytoFLEX の革新的なコンペンセーションライブラリーと DuraClone IM Kit を使ったマルチカラーデータの取得の再現が可能になります。DuraClone IM kit の Dry 試薬は、室温で長期の蛍光色素安定性を保証し、複雑なパネルを少ないピペット操作で行え、データの再現性を高めます。これは、シングルカラーコントロールチューブの再測定を必要とせず、コンペンセーションを自動的に再計算する革新的な CytoFLEX コンペンセーションライブラリーとともに、基礎研究および臨床研究アプリケーションにおいて信頼性と高いソリューションを提供します。

REFERENCES

1. CytoFLEX フローサイトメーター取扱説明書（製品番号 B49006AB）
2. Weit N., Kapinsky M. & Böhmler A. (2015): Advanced analysis of human T cell subsets on the CytoFLEX flow cytometer using a 13 color tube based on DuraClone dry reagent technology. *Beckman Coulter Application Information Bulletin# FLOW-817APP03.15-A.*

NOTES

本アプリケーションシートに示された研究結果は、レーザー構成が 488 nm／638 nm／405 nm のベックマン・コールターCytoFLEX フローサイトメーターで取得された結果です。アナライザーの機種間にパフォーマンスの差があるため、他のフローサイトメーターを使用して同様の結果が得られることは保証できません。

CytoFLEX のレーザー構成：

- 405-nm、80-mW 固体ダイオードレーザー
- 488-nm、50-mW 固体ダイオードレーザー
- 638-nm、50-mW 固体ダイオードレーザー
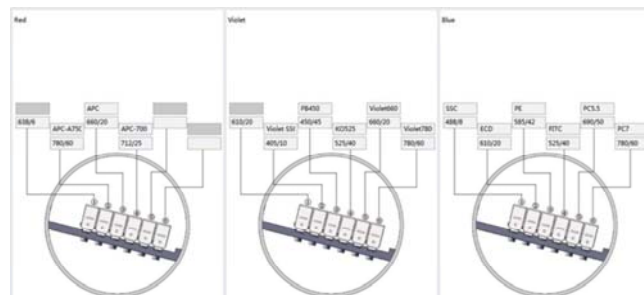
図 18 フィルター構成

試薬の詳細：
以下の DuraClone IM kit は、記述した手順で適用可能です。

		488 Excitation					638 Excitation			405 Excitation	
PN	Panels	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC A647 (4)	A700 (1) APC-A700 (2)	APC-A750 (3)	Pacific Blue*	Krome Orange
B53309	DuraClone IM Phenotyping Basic Tube RUO - 25 tests	CD16	CD56	CD19	-	CD14	CD4 -	CD8 -	CD3	-	CD45
B53318	DuraClone IM B cell Tube RUO - 25 tests	IgD	CD21	CD19	-	CD27	CD24		CD38	IgM	CD45
B53328	DuraClone IM T cell subsets Tube RUO - 25 tests	CD45RA	CCR7	CD28	PD1	CD27	CD4 -	CD8 -	CD3	CD57	CD45
B53351	Dura Clone IM Dendritic cell Tube RUO - 25 tests	CD16	Lineage§	-	CD1c	CD11c	Clec9A -	- CD123	-	HLA-DR	CD45
B53340	DuraClone IM TCRs Tube RUO - 25 tests	TCRgd	TCRab	HLA-DR	-	TCRVd1	CD4 -	CD8 -	CD3	TCRVd2	CD45

§ CD3 / CD19 / CD20 / CD14 / CD56
(1) Alexa Fluor* 700 (2) APC-Alexa Fluor* 700 (3) APC-Alexa Fluor* 750 (4) Alexa Fluor* 647